

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004585

International filing date: 09 March 2005 (09.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-095500
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 26 May 2005 (26.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 5 5 0 0

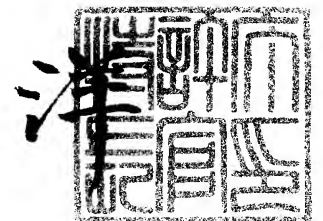
パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 9 5 5 0 0
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 日 本 ゼ オ ン 株 式 会 社

2 0 0 5 年 5 月 1 1 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	2003-482
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C07K 14/03
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内二丁目6番1号 日本ゼオン株式会社内
【氏名】	奥田 尚志
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内二丁目6番1号 日本ゼオン株式会社内
【氏名】	斉藤 修治
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都千代田区丸の内二丁目6番1号 日本ゼオン株式会社内
【氏名】	佐伯 早木子
【特許出願人】	
【識別番号】	000229117
【氏名又は名称】	日本ゼオン株式会社
【代表者】	古河 直純
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	033684
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

伝染性喉頭気管炎ウイルスの g B 遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸 429 個からなるポリペプチド、又はその 1 つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたポリペプチドをコードする DNA を有する組み換えヘルペスウイルス（但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く）。

【請求項 2】

前記 DNA の 3' 末端に、インフレームで配列番号 4 記載のアミノ酸配列、又は、その 1 つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたアミノ酸配列をコードする DNA が連結している請求項 1 記載の組み換えヘルペスウイルス（但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く）。

【請求項 3】

ヘルペスウイルスが鳥類に感染するウイルス（但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く）である請求項 1 又は 2 記載の組み換えヘルペスウイルス。

【請求項 4】

鳥類に感染するヘルペスウイルスが、マレック病ウイルス 1、2 又は 3 型である請求項 3 記載の組み換えヘルペスウイルス。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の組み換えヘルペスウイルスを有効成分とする抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチン。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組み換えヘルペスウイルス及びその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は伝染性喉頭気管炎ウイルス（以下、ILT Vということがある）のg B遺伝子をコードするDNAを有する組み換えヘルペスウイルスとその利用に関し、詳しくは、組み換え体中で安定して存在できるILT Vのg B遺伝子の部分配列を有する組み換えヘルペスウイルス、及び抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

伝染性喉頭気管炎は、伝染性喉頭気管炎ウイルス（Infectious Laryngotracheitis Virus）の感染により発症する。ILT Vは、ニワトリ、キジ、クジャク、シチメンチョウ等の鳥類に感染する。ニワトリにおける発症の特徴としては、呼吸器症状・体温上昇・食欲減退等があらわれ、強い咳や痰の咯出がみられる。また、産卵鶏では発症後4日程度から産卵率が低下し、正常な産卵に戻るまで約1ヶ月を要する。さらに、他の病原体との混合感染による死亡率の上昇等も報告されており、養鶏産業に多大な経済的損失を与えている。

伝染性喉頭気管炎の予防には、従来より、弱毒化したワクチン株による乾燥生ワクチンや凍結生ワクチンが用いられている。しかし、その免疫効果は飼育環境・飼育密度・接種方法等により一様ではない。さらに、ワクチン接種により呼吸器系に若干の症状を起こさせることや、用法・接種量を誤ると発病する危険性もある。また、ある地域ではワクチン株の病原性復帰による発症の報告もあり、安全かつ有効なワクチンの開発が望まれていた。

最近では、この問題点を克服するために、組み換え技術を利用した組み換えウイルスベクターワクチンが開発されている。ILT Vに関しては、ウイルスベクターとしてファウルボックスウイルス（以下FPVという）を用いることが検討され、実際に米国では市販もされている（BIOMUNE社VECTORMUNE F P-L T（+AE））。

【0003】

ILT Vは、伝染性喉頭気管炎の原因ウイルスである。ILT Vはヘルペス属ウイルスの一種で、ウイルスゲノムは約16万塩基対の二本鎖DNAからなる。チミジンキナーゼ遺伝子（Griffinら、J. Gen. Virol.、71、841、（1990）、gp60遺伝子（Kongsuwanら、Virus Genes、7：297-303、1993）、カプシドp40遺伝子（Griffinら、Nucl. Acids Res.、18：366、1990）、糖タンパク質B（gB）遺伝子（Poulsenら、Virus Genes、5：335-347、1991；Griffinら、J. Gen. Virol.、72：393-398、1991；米国特許第5,443,831号公報）、糖タンパク質C（gC）遺伝子（Kingsleyら、Virology、203：336-343、1994）、RR2遺伝子（Griffinら、J. of General Virol.、70：3085-3089、1989）、UL32遺伝子（国際公開WO98/07866号公報）などが知られている。

これらILT Vのg B遺伝子は、オープンリーディングフレーム全長が2613bp（873アミノ酸）であり、この全長遺伝子を挿入した組み換えFPVが、ワクチンとして効果を示すことは、米国特許第5,443,831号公報などに報告されている。

【0004】

ところで、FPVなどのボックスウイルスは、宿主体内で急激に増殖して、抗原タンパク質を発現した後、宿主の免疫系によりほぼ完全に駆逐される。しかし、ウイルス駆逐後も、免疫がメモリーされたり、ブーストされる点で、ボックスウイルスはワクチン用の宿主として好適であるといわれている。一方、HVTなどのヘルペスウイルスは、宿主体内で急激に増殖はせず、持続潜伏感染をし続けて、長期間にわたって、宿主免疫系を刺激し続けるという特徴がある。故に組み換えFPVも組み換えHVTと同様にベクターとして

期待されている。

【0005】

特表平4-501658号公報では、ILTVの抗原遺伝子を七面鳥ヘルペスウイルス（以下、HVTという）に組み込んだ組み換えHVTウイルスが構築し得る旨の記載はあるが、実際に組み換え体を得てはいない。

また、特開2001-000188号公報においては、ILTVのgB遺伝子全長とUL32遺伝子の2つの遺伝子を挿入した組み換えHVT、HF-PecILTVを構築している。そして、免疫蛍光抗体法を用いてインビトロでの発現を確認しているが、ワクチンとしての効果は確認されていない。

【特許文献1】 米国特許第5, 443, 831号公報

【特許文献2】 特表平4-501658号公報

【特許文献3】 特開2001-000188号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

かかる従来技術のもと、本発明者らは、ILTVのgB遺伝子全長の上流にプロモータを連結したDNA分子をヘルペスウイルスゲノムに挿入した組み換えヘルペスウイルスについて、継代培養による純化を試みたが、ILTVのgB遺伝子の脱落が生じ、純化が不可能であることを確認した。gB遺伝子が脱落しては、組み換えヘルペスウイルスが、抗ILTV用ワクチンとして機能しない。また、ILTVとHVTは、どちらもヘルペスウイルスであり、HVT自体にも必須遺伝子であるgB遺伝子が存在する。

そこで、本発明者らは、ウイルス粒子形成時に、gB遺伝子どうしが競合するおそれがあるために、ILTVのgB遺伝子産物の膜アンカー部分及び細胞質ドメインを欠損させて、膜タンパク質ではなく分泌タンパク質とすることにより、競合を回避しつつ抗原性を保持させることが重要と考えた。

この知見に基づき、継代培養にも安定な組み換えヘルペスウイルスを得るべく鋭意検討した結果、単に巻くアンカー部分と細胞質ドメインとを欠損させるだけでなく、さらに所定長さに切り縮めたgB遺伝子であれば、ワクチン効果があること、そして、この切り縮めたgB遺伝子に特定の付加配列を連結させると、より高いワクチン効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0007】

かくして本発明によれば、伝染性喉頭気管炎ウイルスのgB遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸429個からなるポリペプチド、又は、その1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたポリペプチドをコードするDNAを有する組み換えヘルペスウイルス（但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く）が提供される。更に、当該組み換えヘルペスウイルスを有効成分とする抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下に、本発明を詳述する。

（DNA）

本発明に用いるDNAは、ILTVのgB遺伝子によってコードされるタンパク質（以下、gBタンパク質という）の、アミノ末端側の429アミノ酸からなる部分ペプチドをコード（以下、部分gB遺伝子ということがある）するものである。また、この部分ペプチドのアミノ酸配列は、1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、或いは置換されていてもよい。

本発明に用いるDNAの具体例としては、配列番号2記載の429個のアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられ、具体例としては配列番号3記載の塩基配列が挙げられる。

gB遺伝子の起源となるILTVとしては、例えば、NS-175株（家畜衛生菌株目

録の菌株番号V A 0 2 0 4、社団法人動物用生物学的製剤協会）、C E株（幸田、麻布獣医科大学研究報告、31、133-202、1976）、S A-2株（J o h n s o n ら、A r c h . V i r o l .、119、181-198、1991）、強毒野外分離株632株（K e e l e r ら、A v i a n D i s e a s e s、35、920-929、1991）、U S D A チャレンジ株（P o u l s e n ら、J . G e n e r a l . V i r o l .、78、2945-2951、1997）が挙げられる。

g B 遺伝子は、I L T V 由来の g B タンパク質をコードするものであれば良く、たとえば、強毒野外分離株632株由来の g B 遺伝子（G e n e B a n k A C C . N o . X 5 6 0 9 3）、S A 2株由来の g B 遺伝子（G e n e B a n k A C C . N o . M 6 4 9 2 7）などが挙げられる。

【0009】

また、配列番号4記載のアミノ酸配列をコードするD N A（以下、付加D N Aということがある）を、上述した部分 g B 遺伝子の3'末端側にインフレームで連結させることで、ワクチン効果を向上させることができる。配列番号4記載のアミノ酸配列の1つ又は複数個のアミノ酸が欠失、付加、或いは置換されていてもよい。

付加D N Aを部分 g B 遺伝子に、インフレームで連結することが、ワクチン効果を向上させる点で重要である。

配列番号4記載のアミノ酸配列は、既知のなんらかの機能を有する配列、又は、機能が推定されるドメイン配列をもっているものではない。配列番号4記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列120bp（終始コドン含まず）（配列番号5）のうち、87bpはS V 4 0 ポリアデニンシグナル由来であり、16bpがH V TのU L 4 5由来のものであり、13bpが人工的に導入されたS f i I 配列由来、4bpはフランキング配列である。

部分 g B 遺伝子と付加D N Aとをインフレームで連結する方法に格別な制限はなく、遺伝子組み換えの教科書（S a m b r o o k J、R u s s e l D . W . 編M o l e c u l a r C l o n i n g、T h i r d E d .、C o l d S p r i n g H a r b o r L o b o r a t o r y P r e s s）などに記載されている一般的な方法を用いることができる。一般的な方法とは、制限酵素切断面同士で連結する方法が挙げられる。制限酵素認識部位がない場合は、P C R（ポリメラーゼチェーンリアクション）やインビトロ突然変異を用いることにより制限酵素認識部位を導入すればよい。

【0010】

（組み換えヘルペスウイルス）

本発明の組み換えヘルペスウイルスは、親ウイルスとして、I L T V 以外のヘルペスウイルスを用いるものである。親ウイルスであるヘルペスウイルスは、ほ乳類や鳥類に感染するいかなるヘルペスウイルスでもよいが、組み込んだ遺伝子が安定してI L T V 内に存在できないため、I L T V は使用できない。鳥類用ワクチンを得る場合、マレックウイルスを選択するのが望ましい。マレックウイルスは、1、2及び3型の3種類があるが、本発明においてはどの型のものを選択しても良い。これらのマレックウイルスは、天然に得ることができるほか、A T C C などから有償又は無償で入手できるものが挙げられ、特に非病原性のものが好ましい。このようなウイルスとしては、例えば、マレックウイルス1型であれば、C V I 9 8 8（R i s p e n s）株など、マレックウイルス2型であればS B-1株など、マレックウイルス3型（H V T）であれば、F C 1 2 6（A T C C V R-584B）、P B-T H V 1、H-2、Y T-7、及びH P R S-26などが例示できる。

【0011】

組み換えヘルペスウイルスを構築する方法に格別な制限はなく、上述した部分 g B 遺伝子と必要に応じて連結された付加D N Aとを有する組み換え用プラスミドを用い、相同組み換えによって、親ウイルスであるヘルペスウイルスに挿入すれば良い。もちろん、このとき部分 g B 遺伝子は、外来又は内因のプロモータの支配を受ける位置に配置する。

組み換え用プラスミド（以下、ホモロジーベクターという）として用いるプラスミドと

しては、一般に用いられるものでよく、例えば、pBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC8、pUC18、pUC19が例示される。

ホモロジーベクターの構築は、ベクターの有する制限酵素サイトを利用して、常法に従って行えば良い。

ホモロジーベクターは、上述した部分gB遺伝子に、通常はプロモータとポリAシグナルを付加したものを組み換えヘルペスウイルスの増殖に非必須な領域中に挿入したプラスミドである。

以下、本発明のホモロジーベクターの構築方法について、説明する。

【0012】

組み換えヘルペスウイルスにDNAを組み込む場合、高い発現量を得るため、通常、制御遺伝子（プロモータ）の制御下に、本発明のDNA分子が配置されるように組み込む。プロモータは、真核細胞で機能する一般的なものでよく、真核細胞由来でもウイルス由来のものでも構わない。プロモータの具体的な例としては、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモータ（RossらJ. Gen. Virol.、74:371-377、1993）、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）及びマレックウイルス（MDV）1型のgBタンパク質プロモータ（Rossら、J. Gen. Virol.、74:371-377、1993）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）のIEプロモータ（Stinskiら、J. Virol.、55:431-441、1985）、SV40プロモータ（Gunningら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、84:4831-4835、1987）、ヒト β アクチンプロモータ（GunningらProc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、84:4831-4835、1987）、ニワトリ β アクチンプロモータ（Kostら、Nucleic Acids Res.、11:8287-8301、1983）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）のLTRプロモータ（Greuelら、Virology 177:33-43、1990）、Pecプロモータ（特開2001-000188号公報）などが例示される。

プロモータに加えて、転写を活性化する因子であるエンハンサーを加えることにより、さらに効率的な発現が予想される（Stinskiら、J. Virol.、55:431-441、1985）。エンハンサーは、サイトメガロウイルス由来プロモータの一部などが例示され、挿入遺伝子との位置的関係は通常限定されない。このタイプのプロモータとして、特開2001-000188号公報において示されているPecプロモータなどが例示される。

【0013】

このほか、更に、付加配列の下流に、ポリAデニレーションシグナルを付加すると、組み換えヘルペスウイルスの場合、特に高い発現量が得られることが期待される。

ポリAデニレーションシグナルとしては、SV40などのPolyAシグナル（Gunningら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、84:4831-4835、1987）やマレックウイルス（MDV）1型のUL46h、UL47h、UL49hのPolyAシグナル（YanagidaらJ. Gen. Virol.、74:1837-1845、1993）が例示される。

【0014】

ヘルペスウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域は、例えばマレックウイルス（MDV）1型、2型、及び3型（3型は七面鳥ヘルペスウイルスである）を例にとると、TK領域（Rossら、16th International Herpes Workshop、1991）、US10領域（SakaguchiらVaccine、12:953-957、1994）、US2領域（Sondermeijer. P. J.ら、Vaccine、11:349-358、1993）、特開平11-192093に記載のUL44と45の間の領域やUL45と46の間の領域を例示することができる。

部分gB遺伝子や付加DNAなどの外来遺伝子を、この非必須領域中に挿入して、ホモロジーベクターを構築する。本発明のDNA分子などの外来遺伝子を挿入するための非必

須領域の長さは特に限定されないが、外来遺伝子挿入部位の前後に10bp、好ましくは100bp以上、より好ましくは500bp以上の塩基があればよい。

【0015】

上述のホモロジーベクターと親ウイルスとなるヘルペスウイルスとの間に相同組み換えを起こさせて組み換えヘルペスウイルスを得る。

組み換えヘルペスウイルスを作製する具体的な方法としては、以下に説明する方法が挙げられる。

ホモロジーベクターをヘルペスウイルス感染細胞に、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクチンを用いた方法、遺伝子銃を用いた方法などで導入する。たとえば鳥類ヘルペスウイルスの場合、ヘルペスウイルスを感染させる細胞は、鳥類由来の細胞が望ましく、たとえばCEF（ニワトリ胚繊維芽細胞）、発育鶏卵、鶏腎臓細胞などが挙げられる。感染細胞の培養は、通常行われる培養法でよい。ホモロジーベクターを感染細胞に導入する方法は、高い導入効率が見られる点から、エレクトロポレーションやリポフェクチンを用いた方法を採用することが望ましい。導入するホモロジーベクター（プラスミド等）の量を0.1～1000μgの範囲とすると、ヘルペスウイルスのゲノムDNAとホモロジーベクターの相同領域との間での組み換えヘルペスウイルスの発生率が高くなる。このようなホモロジーベクターを導入した組み換えヘルペスウイルスのみを選択するためには、BPA（Black Plaque Assay）法を用いることができる。BPA法とは、外来遺伝子に対する抗体を用いて、免疫反応を行い、外来抗原を発現したプラークを可視化する方法で、外来遺伝子に対する抗体を用いて、次に酵素標識をした二次抗体を用いて、最後に対応する基質を用いて可視化する。この方法により、外来抗原遺伝子を発現した組み換えHVTを選択する。また、これら組み換えHVTを作製する場合、検出が容易であるという利点があるため、外来遺伝子としてβ-ガラクトシダーゼなどのマーカー遺伝子を組み込むこともでき、この場合Blu-o-Gal（インビトロジェン社製）などを用いて簡単に発現をモニターして組み換え体を単離する。それ以外ではプラークハイブリダイゼーションなどの方法により目的とする組み換えヘルペスウイルスを単離する。これら操作を繰り返すことによって、組み換えHVTを純化する。

【0016】

（抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチン）

本発明の抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンは、上述した本発明の組み換えヘルペスウイルスを有効成分とする鳥類用の生ワクチンである。

ワクチンの調製方法に格別な制限はなく、例えば以下の方法により調製することができる。

本発明の組み換えヘルペスウイルスの感染細胞を当該ウイルスが生育できる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させた後、細胞をスクレーパー又はトリプシンではがし、遠心分離によって感染細胞と上清とに分離する。たとえば鳥類ヘルペスウイルスの場合、宿主細胞としては、鳥類由来の細胞が好ましく、CEF（ニワトリ胚繊維芽細胞）、鶏腎臓細胞などを好適に使用することができる。得られた感染細胞は、10%のジメチルスルフォキシド（DMSO）を含む培養用培地に懸濁し、液体窒素下で凍結保存する。ワクチンとして使用する時は、100倍量のリン酸緩衝液や生理食塩水などにこの凍結保存品を溶かして使用する。

【0017】

液体窒素下で上記感染細胞を保存するための安定剤やその他の成分は、ウイルス感染細胞が安定的に生存でき、かつレシピエントにとって薬理学的に問題のない成分であれば特に限定されない。

このようにして作製した組み換えヘルペスウイルスを主成分とする生ワクチンの鳥への投与方法は特に限定されない。例えば、鳥個体の皮下に注射する方法や、発育鶏卵に卵に穴をあけて接種する方法など、現行のヘルペスウイルスワクチンと同じ方法が挙げられる。

接種量や接種時期も従来ワクチンと同様でよい。例えば、孵化当日のニワトリの背部皮

下に102～104PFU又は102～104TCID₅₀を20G以上の針を用いて接種することにより、ワクチンとしての効果が期待される。また発生後18～19日目の発育鶏卵に穴をあけて上記と同様のドーズを接種してもよい。接種は、同様に26Gの針で接種する以外に、Inovoject (Embrex社)などのin ovo接種装置を用いて接種することが可能である。

上記のようにして得られた組み換えヘルペスウイルスは、ILTVに対するワクチンとしてばかりでなく、親ウイルスとなったヘルペスウイルスに対するワクチンとしても機能する。

【実施例】

【0018】

(実施例1) ILTV gB遺伝子全長をもつ組み換え用プラスミド (ホモロジーベクター) の構築

米国公開2003-0059799号公報記載のpGHMC SpolyASfiのBglI切断125bp断片を国際公開99/18215号公報記載のpNZ45/46SfiのSfiI断片に挿入して、p45/46HMC SpolyASfiを構築した。国際公開99/18215号公報記載のpUC18Xlacをテンプレートとして、配列番号6のプライマーM13(-21)と配列番号7のプライマーlac3'KpnRでPCRを行い、3205bpの断片を得た。

【0019】

尚、PCRは、Pfu Polymerase (Stratagene社)を用いて、PerkinElmer社のDNA Thermal Cycler 480を用いて、通常条件(95℃1分、アニール温度を60℃又は55℃、72℃3分)で30サイクル行った。また、全実施例において特に断りがないかぎりこの条件で行った。

【0020】

このPCRで増幅した3205bpの断片をBamHIとKpnIで切断して得られた3149bp断片と、p45/46HMC SpolyASfiをBamHIとKpnIとで切断して得られた5573bp断片とをライゲーションしてpNZ45/46HlacpolyASfiを構築した。

一方、pBK-CMV (Stratagene社)をテンプレートとして、配列番号6のプライマーM13(-21)と配列番号8のプライマーpCMV-1を用いてPCRを行い、953bpの断片を得て、これをPstIとNheIで切断して得られた599bp断片と、pNZ45/46HlacpolyASfiをPstIとSphIとで切断して得られた382bp断片と、pNZ45/46HlacpolyASfiをSphIとXbaIとで切断して得られた8332bp断片とを3断片ライゲーションしてpNZ45/46HCMVlacを構築した。

【0021】

ILTV gB遺伝子内のBglI切断部位をアミノ酸置換なしで欠失する目的で、特開平10-807866号公報記載のpGTPs/ILgBをテンプレートにして、配列番号9記載のプライマーILgB-5と配列番号10記載のプライマーILgB-BglRでPCR増幅をして得られた1132bp断片と、配列番号11記載のプライマーILgB-Bglと配列番号12記載のプライマーILgB-3+KpnでPCR増幅をして得られた1564bp断片の2断片を得た。この2断片をテンプレートとして、配列番号9記載のプライマーILgB-5と配列番号12記載のプライマーILgB-3+KpnでPCRを行い、2648bp断片を得た。この2648bp断片をBamHIとKpnIで切断して得られた2638bp断片を、特開2001-000188号公報記載のpGIPecをBamHIとKpnIとで切断して得られた3280bp断片とライゲーションしてpGIPecILgBを構築した。

このpGIPecILgBをBamHIとKpnIで切断した2638bpの断片と、ヨーロッパ特許第1298139号公報に記載のpGIBacpAをBamHIとKpnIとで切断して得られた4479bp断片とをライゲーションして、pGIBAcgBp

Aを構築した。

このpGIBAcgBpAをBg1Iで切断して得られた4464bp断片を、前述のpNZ45/46HCMVlacのSfiI部位に挿入することによって、プロモータとしてCMV-IEを有するホモロジーベクターp45/46HCMVlacBacgB2ndを構築した。

【0022】

次にCMVプロモータ内のBg1I切断部位をつぶす目的で、特開2001-000188号公報記載のpGIPecをテンプレートとして、配列番号8記載のプライマーpCMV-1と配列番号13記載のプライマーpPec1RでPCR増幅をした293bpの断片を得た。pBK-CMV(Stratagene社)をテンプレートとして配列番号14のプライマーpCMV-olと配列番号15のプライマーpCMV-R1でPCR増幅をした341bp断片を得た。これら2断片をテンプレートとして、配列番号8記載のプライマーpCMV-1と配列番号15記載のプライマーpCMV-R1でPCR増幅をし、604bp断片を得た。この604bp断片をPstIとXbaIで切断して得られた589bp断片と、特開2001-000188記載のpGIPecをPstIとXbaIとで切断して得られた2765bp断片とライゲーションしてpGICMV(-)を構築した。

このpGICMV(-)をBamHIとXhoIとで切断して得られた2137bp断片と、前述のpGIBAcgBpAをBamHIとXhoIとで切断して得られた4054bp断片をライゲーションし、pCMV-ILgBを構築した。このpCMV-ILgBをBg1Iで切断して得られた3338bp断片を、pNZ45/46RSVlac-TのSfiI部位に挿入することによって、プロモータとしてCMV-IEを有するホモロジーベクターp45/46CMVILgBlacを構築した。

【0023】

特開2001-000188号公報記載のpGIPecをBamHIとXhoIとで切断して得られた2103bp断片と、前述のpGIBAcgBpAをBamHIとXhoIとで切断して得られた4054bp断片とをライゲーションしてpGIPecILgB2を構築した。

このpGIPecILgB2をBg1Iで切断して得られた3504bp断片を、特開平11-192093記載のpNZ45/46RSVlac-TのSfiI部位に挿入することによって、プロモータとしてPecプロモータを有するホモロジーベクターp45/46PecILgBlacを構築した。

同様に、前述のpGIPecILgB2をBg1Iで切断して得られた3504bp断片を、特開平11-192093記載のpNZ45/46SfiのSfiI部位に挿入することによって、プロモータとしてPecプロモータを有するホモロジーベクターp45/46PecILgBを構築した。

【0024】

(実施例2) ILTVgB遺伝子全長をもつ組み換えHVTの構築と純化

実施例1で構築した4つのホモロジーベクター(p45/46HCMVlacBacgB2nd、p45/46CMVILgBlac、p45/46PecILgBlac、p45/46PecILgB)を用いて組み換えHVTを構築し、その純化を行った。

具体的には以下の通りである。

【0025】

まず、Morganら(Avian Dis.、Vol. 34、345-351、1990)の方法に従って、HVTのDNAを回収した。つまり、約 10^5 PFUのHVT、FC126株(ATCC VR-584B)又は、FC126株(Witter博士より分与されたオリジナル株)を約 3×10^7 個のCEFに感染させ、2~3日培養した後、lysis Buffer(0.5% SDS、10mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl、1mM EDTA、200 μ g/ml Proteinase K)を4ml加えて、37℃で4時間インキュベートした後、フェノール抽出、エタノール沈殿

を行って、HVT-DNAを回収した。

ホモロジーベクターは、制限酵素を用いて、相同部位や外来遺伝子を含まない部分で、切断し、直鎖状にした。

トリプシンを用いて回収した、約 3×10^6 個のCEFをSaline G (0.14 M NaCl、0.2 mM KCl、1.1 mMリン酸水素二ナトリウム、1.5 mMリン酸水素一カリウム、0.5 mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁し、先述のHVT-DNA 10~30 μ gと、直鎖状にした組み換え用ホモロジーベクター10~30 μ gをそれぞれ室温においてジーンバルサー (Bio-Rad社製)を用いて、0.5 KV cm^{-1} 、0.4 msecの条件下でエレクトロポレーションした。この細胞懸濁液を直径6 cmの細胞皿に播き、生育培地を加えて、5~7日間培養した。これを回収して、組み換えHVTを含むウイルスを回収した。この組み換えHVTは限界希釈法により、純化を行った。

【0026】

純化の具体的な方法は以下の通りである。

lacZ遺伝子を含まないホモロジーベクターp45/46 PeciLgBについては、約 2×10^6 個のCEFと共に段階希釈したウイルス液と共に、96 well plateに撒いた。3~5日培養して、プラークが出現後、レプリカを作製した。このうちの1つのプレートに対して、次の通りBPA (Black Plaque Assay)法によりスクリーニングを行うことにした。

【0027】

ILTV-gBタンパク質を大腸菌で発現させたタンパク質をウサギに免疫して得た抗血清 (抗ILTV-gB抗血清)を通常細胞培養に用いられるマグネシウムを含まないダルベッコ (Dulbecco's)リン酸バッファー (大日本製薬社製;以下、PBS (-)という)で約500倍に希釈したものを、22~25℃で2時間、プラークと反応させた。3% Non-fat dried milk in PBS (-)で3度洗浄した後、ピオチン化抗ウサギ抗体 (ヒツジ、Biosource社)で22~25℃、2時間、プラークと反応させた。反応後の抗体をPBS (-)で洗浄した後、アビジン-ピオチン-アルカリフォスフォターゼComplex (Vector laboratories)で反応させた。未反応のアビジン-ピオチン-アルカリフォスフォターゼComplexをPBS (-)でリンスすることによって洗い流した後、アルカリフォスフォターゼの基質であるBCIP/NBT (ロシュ社製)を用いて、濃紺から黒色に呈色させた。

BPA法は、こうして発生した陽性のプラークに対応する懸濁ウイルス液を再度、CEFに感染させることによって、さらに同様の操作を3~4回繰り返して全てのプラークがBPAにより陽性となるまで行い、通常は、組み換えHVTの純化構築を完了するものである。

しかし、p45/46 PeciLgBを組み込んだ組み換えHVTについては、100%純化された組み換えHVTを得ることはできなかった。

【0028】

lacZを含むホモロジーベクターp45/46 HCMVlacBacgB2nd、p45/46 CMVILgB1ac、及びp45/46 PeciLgB1acを用いた組み換えHVT構築は、以下の手順によって行った。

即ち、約 2×10^6 個のCEFと共に段階希釈したウイルス液と共に、培養用平底96ウェルマルチプレートに播いた。3~5日培養して、プラークが出現後、レプリカを作製した。このうちの1つのプレートに対して、 β -ガラクトシダーゼの発色基質であるブルーガル (Bluo-gal: GIBCO社製)を100 μ g/mlを100 μ l/wellずつ加え、37℃において約4時間インキュベートした。lacZを発現するプラークは青変するので、青変プラークを含むウェルに対応するもう一つのプレートのウェルより細胞を回収することによりウイルス液とする。このウイルス液を上記と同様に約 2×10^6 個のCEFと共に培養用平底96ウェルマルチプレートに播いた。培養用平底96ウェルマルチプレートから培養用平底96ウェルマルチプレートに一回継代する行程を一回

のスクリーニングとする。スクリーニングを全ウェルが青ブランクになるまで繰り返し、ブルオガルを加えたときに全ブランクが青変するまで（通常、だいたい5～10回のスクリーニング）純化を行った。

その結果、ホモロジーベクター p45/46PecILgBlacからのみ、1クロンの組み換えHVTの純化に成功し、これをFW050と名づけた。

p45/46HCMVlacBacgB2ndとp45/46CMVILgBlacを用いた場合については、100%純化された組み換えHVTが得られなかった。

【0029】

（実施例3）組み換えHVT FW050の構造とワクチン効果

実施例2で得られた組み換えHVTであるFW050のダイレクトシーケンスを行った。その結果、FW050は、PolyAシグナルを含む1542bpが欠失していて、その代わりに由来不明の3塩基（GCG）が挟まれていることが判明した（配列番号22）。その結果、ILTVgB遺伝子本来のORFのアミノ末端側にある429個のアミノ酸と、終止コドンがでるまでPolyAシグナル部分がコードすることになった40アミノ酸とからなる469アミノ酸で構成されたキメラタンパク質を発現するであろうことが予測された（図1及び配列番号1参照）。

【0030】

このFW050について、ワクチン効果を調べる動物実験を行ったところ、表1のような結果となった。

動物実験は、基本的に、USDA、APHISが定めた9CFRに基づいて行った。

強毒ILTVチャレンジについては、9CFR Ch.1 113.328に記載されている方法を用いて行った。つまり、各群10羽以上の試験用SPF鶏（LineM：日本生物科学研究所）に、組み換えHVTを接種した（実験1でのみ、FW050については接種後、事故死のために、接種鶏数は9となっている）。陰性対照群（コントロール）は非接種とした。

試験用SPF鶏が孵化したとき、組み換えHVT FW050を鶏の背部皮下に10⁴PFUとなるように26Gの注射針を使って接種した。4週齢で、強毒ILTV、NS-175株 10³・0EID₅₀/0.1mlを眼窩下洞に接種して攻撃した。接種後10日間、毎日臨床症状を観察して、感染防御したか否かを判断した。

結果を表1に示す。

表1から判るとおり、FW050については、ILTV強毒株に対する防御効果が認められた。

【0031】

【表1】

（表 1）

	組み換え HVT	ホモロジーベクター	防御率 %（防御羽数／全羽数）	
			実験1	実験2
コントロール			0（0／10）	0（0／16）
チャレンジ	FW050	p45／46PecILgBlac	78（7／9）	31（4／13）

【0032】

（実施例4）ILTVのgB遺伝子を切り縮めた断片をもつ組み換え体の構築

ILTVのgB遺伝子ORFを一部欠失させた変異体gB遺伝子産物をもつ以下の通りホモロジーベクターを構築した。

【0033】

（1）ILTVのgB遺伝子ORFでダイマー形成領域を含まないであろうアミノ末端から623アミノ酸gB-aをコードするDNAを含むホモロジーベクター：p45/46PecILgBaおよびp45/46PecILgBalac

実施例 1 で構築した p G I P e c I L g B 2 をテンプレートとして用いて、配列番号 16 記載のプライマー P-B g l I I と配列番号 17 記載のプライマー A-R を用いて、前述の常法で P C R を行い、1205 b p の断片を増幅した。これを B g l I I と K p n I で切断して得られた 1198 b p 断片と、実施例 1 で構築した p 45 / 46 P e c I L g B を B g l I I と K p n I とで切断して得られた 7057 b p 断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクター p 45 / 46 P e c I L g B a を構築した。

p 45 / 46 P e c I L g B a を B g l I I と X h o I とで切断して得られた 6373 b p 断片と、実施例 1 で構築した p 45 / 46 P e c I L g B l a c を B g l I I と X h o I とで切断して得られた 5923 b p 断片とをライゲーションして、ホモロジーベクター p 45 / 46 P e c I L g B a l a c を構築した。

【0034】

(2) 膜貫通領域の直前まで、カルボキシ末端を削った 691 アミノ酸 g B-b をコードする D N A を含むホモロジーベクター： p 45 / 46 P e c I L g B b および p 45 / 46 P e c I L g B b l a c

実施例 1 で構築した p G I P e c I L g B 2 をテンプレートとして用いて、配列番号 16 記載のプライマー P-B g l I I と配列番号 18 記載のプライマー B-R を用いて、前述の常法で P C R を行い、1409 b p の断片を増幅した。これを B g l I I と K p n I で切断して得られた 1402 b p 断片と、実施例 1 で構築した p 45 / 46 P e c I L g B を B g l I I と K p n I とで切断して得られた 7057 b p 断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクター p 45 / 46 P e c I L g B b を構築した。

p 45 / 46 P e c I L g B b を B g l I I と X h o I とで切断して得られた 6577 b p 断片と、実施例 1 で構築した p 45 / 46 P e c I L g B l a c を B g l I I と X h o I とで切断して得られた 5923 b p 断片とをライゲーションして、ホモロジーベクター p 45 / 46 P e c I L g B b l a c を構築した。

【0035】

(3) 膜貫通領域のみを削除した 803 アミノ酸 g B-c をコードする D N A を含むホモロジーベクター： p 45 / 46 P e c I L g B c および p 45 / 46 P e c I L g B c l a c

実施例 1 で構築した p G I P e c I L g B 2 をテンプレートとして用いて、配列番号 16 記載のプライマー P-B g l I I と配列番号 19 記載のプライマー C-R を用いて、前述の常法で P C R を行い、1409 b p の断片を増幅した。また、同様に p G I P e c I L g B 2 をテンプレートとして、配列番号 20 記載のプライマー C-F と配列番号 21 記載のプライマー C D E-R を用いて、常法で P C R を行い、357 b p の断片を増幅した。1409 b p と 357 b p の 2 つの断片をテンプレートとして、配列番号 16 記載のプライマー P-B g l I I と配列番号 21 記載のプライマー C D E-R を用いて、常法で P C R を行い、1745 b p の断片を増幅した。これを B g l I I と K p n I で切断して得られた 1738 b p 断片と、実施例 1 で構築した p 45 / 46 P e c I L g B を B g l I I と K p n I とで切断して得られた 7057 b p 断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクター p 45 / 46 P e c I L g B c を構築した。

p 45 / 46 P e c I L g B c を B g l I I と X h o I とで切断して得られた 6913 b p 断片と、実施例 1 で構築した p 45 / 46 P e c I L g B l a c を B g l I I と X h o I で切断して得られた 5923 b p 断片とをライゲーションして、ホモロジーベクター p 45 / 46 P e c I L g B c l a c を構築した。

【0036】

これらホモロジーベクターの模式図を図 2 に示す。

以上に述べたように構築した 6 つのホモロジーベクターを用いて、実施例 2 と同様に組み換え H V T の純化を行ったが、ホモロジーベクターと同じ構造の組み換え体を得られなかった。

【0037】

以上のように、プロモータに続けて、g B タンパク質のカルボキシ末端から切り縮めた

様々なホモロジーベクターを構築し、組み換えHVTの純化構築を試みたが、度重なる実験に関わらず、ホモロジーベクターと同じILTVgB遺伝子の長さをもつ組み換えHVTは得られなかった。この結果より、プロモータと共に組みこんだgB遺伝子を組み換えHVTで発現しようとした場合、長いORFのものは純化が不可能であり、純化できたとしても選択圧によりgB遺伝子のORFが短くなってしまうことが考えられ、プロモータに続けて発現を行った場合、安定な組み換えHVTとして存在できるILTVのgB遺伝子ORFの長さは623アミノ酸をコードするもの程度か、これよりも短かいであろうことが判った。

【0038】

(実施例5) 欠失クローンFW050を元にした改変とその組み換えHVTのワクチン効果

ILTVのgBタンパク質のアミノ末端側429アミノ酸と、ポリA由来の40アミノ酸とを融合したタンパク質を発現するであろう、実施例3でワクチン効果が確認された組み換えHVT FW050から、発現するタンパク質のポリA由来の40アミノ酸を欠失させたタンパク質を発現させるべく、ホモロジーベクターp45/46CMVILgBfを構築した。

【0039】

具体的には、特開2004-000111号公報記載のpGIBacpAをEcoRIとKpnIとで切断して得られた303bp断片と、実施例1で構築したpGIPecILgB2をEcoRIとKpnIで切断して得られた5854bp断片とをライゲーションして、pGIPecILgB3を構築した。このpGIPecILgB3をBglIIとSfiIとで切断して得られた2245bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBのBglIIとSfiIで切断して得られた6759bp断片とをライゲーションしてp45/46PecILgB2を構築した。

次に、pGIPecILgB2をテンプレートとして、配列番号16のP-BglIIと配列番号23のF-RでPCRを行って623bpの断片を得た。これをBglIIとKpnIで切断して得られた616bp断片と、p45/46PecILgB2をBglIIとKpnIで切断して得られた7057bp断片とをライゲーションして、p45/46PecILgBfを構築した。

このp45/46PecILgBfをXbaIで完全切断した後、PstIで部分切断を行って得られた7102bp断片と、実施例1で構築したpGICMV(一)をPstIとXbaIとで切断して得られた589bp断片とをライゲーションすることによりホモロジーベクターp45/46CMVILgBfの構築を完了した。

このホモロジーベクターp45/46CMVILgBfを用いて、組み換えHVTであるFW063を構築し純化した。組み換えHVT FW063の挿入遺伝子部分がホモロジーベクターの塩基配列と同一であり、変異がないことを確認した。

【0040】

さらに、FW050より逆にクローニングしてホモロジーベクターp45/46PecILgBdel1acを、以下の手順で構築した。

このクローニング時に用いたPCRのテンプレートは、FW050をニフトリに接種し回収したウイルスDNAであり、プライマーは、配列番号16のP-BglIIと配列番号24の45/46F(K)の2つのプライマーにより増幅して得られた944bp断片をBglIIとSfiIで切断して得られた707bp断片と、p45/46PecILgB1acをBglIIとSfiIで切断して得られた10809bp断片とをライゲーションして、ホモロジーベクターp45/46PecILgBdel1acを構築した。このホモロジーベクターp45/46PecILgBdel1acを用いて、組み換えHVT FW069の純化構築に成功した。

【0041】

上記FW050と同様に、PolyA部分は全く変えずに、gBタンパク質のアミノ末端側429アミノ酸のORFが終了した箇所にターミネーションを入れたホモロジーベク

ター p 4 5／4 6 P e c I L g B d e l l a c＋S T P を、以下の手順で構築した。

まず配列番号 1 6 のプライマー P－B g l I I と配列番号 2 5 のプライマー g B d e l S T P－R を用いて増幅した 6 3 7 b p 断片と、配列番号 2 6 のプライマー g B d e l S T P－F と配列番号 2 7 のプライマー 4 5／4 6 F（B）を用いて増幅した 6 7 3 b p 断片とをテンプレートとして、プライマー P－B g l I I とプライマー 4 5／4 6 F（B）で P C R を行うことにより、1 2 6 3 b p の断片を得て、これを B g l I I と S f i I で切断して得られた 7 0 7 b p 断片と、p 4 5／4 6 P e c I L g B l a c の B g l I I－S f i I 1 0 8 0 9 b p 断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクター p 4 5／4 6 P e c I L g B d e l l a c＋S T P を構築した。

このホモロジーベクター p 4 5／4 6 P e c I L g B d e l l a c＋S T P を用いて、組み換え H V T F W 0 7 0 の純化構築に成功した。

【 0 0 4 2 】

このように、実施例 3 に示された F W 0 5 0 と同じく g B 遺伝子の O R F が 4 2 9 アミノ酸である F W 0 6 3、F W 0 6 9 及び F W 0 7 0 は、問題なく純化できた。このことから、配列番号 2 記載のアミノ酸配列のアミノ末端側 4 2 9 アミノ酸をコードする g B 遺伝子由来の D N A を、プロモータと共に組み込んだ組み換え H V T で発現しようとした場合、純化が可能であることがわかった。

こうして純化された組み換え H V T である F W 0 6 3、F W 0 6 9、及び実施例 3 で純化された F W 0 5 0 を用いて、実施例 3 と同様に、ニフトリに対するチャレンジ実験を行い、ワクチン効果を調べた。結果を表 2 に示す。

【 0 0 4 3 】

【表 2】

(表 2)			
	組み換え HVT	ホモロジーベクター	防御率 % (防御羽数／全羽数) × 100
コントロール			0 (0／7)
チャレンジ	FW050	p45／46PecILgBlac	54 (7／13)
チャレンジ	FW063	p45／46CMVILgBf	33 (5／15)
チャレンジ	FW069	p45／46PecILgBdellac	56 (9／16)

【 0 0 4 4 】

この結果から、付加配列のない F W 0 6 3 にもワクチン効果は認められ、付加配列のある F W 0 6 9 及び F W 0 5 0 はより優れたワクチン効果を示すことが判った。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 5 】

【図 1】 F W 0 5 0 と元のホモロジーベクターとの比較を示す図である。

【図 2】 ホモロジーベクターの模式図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Zeon Corp.

<120> rHVT-ILTV

<130> rHVT-ILTV

<160> 27

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Infecitous laryngotracheitis virus and artificial ORF

<400> 1

Met	Ala	Ser	Leu	Lys	Met	Leu	Ile	Cys	Val	Cys	Val	Ala	Ile	Leu	Ile
1				5					10					15	

Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Gln	Asp	Ser	His	Gly	Ile	Ala	Gly	Ile	Ile	Asp
			20					25					30		

Pro	Arg	Asp	Thr	Ala	Ser	Met	Asp	Val	Gly	Lys	Ile	Ser	Phe	Ser	Glu
		35					40					45			

Ala	Ile	Gly	Ser	Gly	Ala	Pro	Lys	Glu	Pro	Gln	Ile	Arg	Asn	Arg	Ile
50						55					60				

Phe	Ala	Cys	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Arg	Leu	Ala	Gln
65					70					75					80

Pro	Arg	His	Cys	His	Arg	His	Ala	Asp	Ser	Thr	Asn	Met	Thr	Glu	Gly
				85					90					95	

Ile	Ala	Val	Val	Phe	Lys	Gln	Asn	Ile	Ala	Pro	Tyr	Val	Phe	Asn	Val
			100					105						110	

Thr Leu Tyr Tyr Lys His Ile Thr Thr Val Thr Thr Trp Ala Leu Phe
115 120 125

Ser Arg Pro Gln Ile Thr Asn Glu Tyr Val Thr Arg Val Pro Ile Asp
130 135 140

Tyr His Glu Ile Val Arg Ile Asp Arg Ser Gly Glu Cys Ser Ser Lys
145 150 155 160

Ala Thr Tyr His Lys Asn Phe Met Phe Phe Glu Ala Tyr Asp Asn Asp
165 170 175

Glu Arg Glu Lys Lys Leu Pro Leu Val Pro Ser Leu Leu Arg Ser Thr
180 185 190

Val Ser Lys Ala Phe His Thr Thr Asn Phe Thr Lys Arg His Gln Thr
195 200 205

Leu Gly Tyr Arg Thr Ser Thr Ser Val Asp Cys Val Val Glu Tyr Leu
210 215 220

Gln Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Tyr Phe Gly Met Ala Thr Gly
225 230 235 240

Asp Thr Val Glu Ile Ser Pro Phe Tyr Thr Lys Asn Thr Thr Gly Pro
245 250 255

Arg Arg His Ser Val Tyr Arg Asp Tyr Arg Phe Leu Glu Ile Ala Asn
260 265 270

Tyr Gln Val Arg Asp Leu Glu Thr Gly Gln Ile Arg Pro Pro Lys Lys
275 280 285

Arg Asn Phe Leu Thr Asp Glu Gln Phe Thr Ile Gly Trp Asp Ala Met
290 295 300

Glu Glu Lys Glu Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Trp Ile Glu Val Pro

305 310 315 320

Glu Ala Val Arg Val Ser Tyr Lys Asn Ser Tyr His Phe Ser Leu Lys
325 330 335

Asp Met Thr Met Thr Phe Ser Ser Gly Lys Gln Pro Phe Asn Ile Ser
340 345 350

Arg Leu His Leu Ala Glu Cys Val Pro Thr Ile Ala Ser Glu Ala Ile
355 360 365

Asp Gly Ile Phe Ala Arg Lys Tyr Ser Ser Thr His Val Arg Ser Gly
370 375 380

Asp Ile Glu Tyr Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Phe Leu Ile Ala Phe Gln
385 390 395 400

Lys Leu Met Ser His Gly Leu Ala Glu Met Tyr Leu Glu Glu Ala Gln
405 410 415

Arg Gln Asn His Leu Pro Arg Gly Arg Glu Arg Arg Gln Gly Asp Leu
420 425 430

Tyr Lys Cys Gly Met Ala Asp Tyr Asp His Glu Gln Thr Val Arg Thr
435 440 445

Glu Gly Pro Glu Met Ser Leu Gly Thr Val Asn Arg Pro Ile Arg Pro
450 455 460

Ile Tyr Ser Ser His
465

<210> 2

<211> 429

<212> PRT

<213> Infectious laryngotracheitis virus

<400> 2

Met Ala Ser Leu Lys Met Leu Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Leu Ile
1 5 10 15

Pro Ser Thr Leu Ser Gln Asp Ser His Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asp
20 25 30

Pro Arg Asp Thr Ala Ser Met Asp Val Gly Lys Ile Ser Phe Ser Glu
35 40 45

Ala Ile Gly Ser Gly Ala Pro Lys Glu Pro Gln Ile Arg Asn Arg Ile
50 55 60

Phe Ala Cys Ser Ser Pro Thr Gly Ala Ser Val Ala Arg Leu Ala Gln
65 70 75 80

Pro Arg His Cys His Arg His Ala Asp Ser Thr Asn Met Thr Glu Gly
85 90 95

Ile Ala Val Val Phe Lys Gln Asn Ile Ala Pro Tyr Val Phe Asn Val
100 105 110

Thr Leu Tyr Tyr Lys His Ile Thr Thr Val Thr Thr Trp Ala Leu Phe
115 120 125

Ser Arg Pro Gln Ile Thr Asn Glu Tyr Val Thr Arg Val Pro Ile Asp
130 135 140

Tyr His Glu Ile Val Arg Ile Asp Arg Ser Gly Glu Cys Ser Ser Lys
145 150 155 160

Ala Thr Tyr His Lys Asn Phe Met Phe Phe Glu Ala Tyr Asp Asn Asp
165 170 175

Glu Arg Glu Lys Lys Leu Pro Leu Val Pro Ser Leu Leu Arg Ser Thr
180 185 190

Val Ser Lys Ala Phe His Thr Thr Asn Phe Thr Lys Arg His Gln Thr
195 200 205

Leu Gly Tyr Arg Thr Ser Thr Ser Val Asp Cys Val Val Glu Tyr Leu
210 215 220

Gln Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Tyr Phe Gly Met Ala Thr Gly
225 230 235 240

Asp Thr Val Glu Ile Ser Pro Phe Tyr Thr Lys Asn Thr Thr Gly Pro
245 250 255

Arg Arg His Ser Val Tyr Arg Asp Tyr Arg Phe Leu Glu Ile Ala Asn
260 265 270

Tyr Gln Val Arg Asp Leu Glu Thr Gly Gln Ile Arg Pro Pro Lys Lys
275 280 285

Arg Asn Phe Leu Thr Asp Glu Gln Phe Thr Ile Gly Trp Asp Ala Met
290 295 300

Glu Glu Lys Glu Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Trp Ile Glu Val Pro
305 310 315 320

Glu Ala Val Arg Val Ser Tyr Lys Asn Ser Tyr His Phe Ser Leu Lys
325 330 335

Asp Met Thr Met Thr Phe Ser Ser Gly Lys Gln Pro Phe Asn Ile Ser
340 345 350

Arg Leu His Leu Ala Glu Cys Val Pro Thr Ile Ala Ser Glu Ala Ile
355 360 365

Asp Gly Ile Phe Ala Arg Lys Tyr Ser Ser Thr His Val Arg Ser Gly
370 375 380

Asp Ile Glu Tyr Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Phe Leu Ile Ala Phe Gln
385 390 395 400

Lys Leu Met Ser His Gly Leu Ala Glu Met Tyr Leu Glu Glu Ala Gln
405 410 415

Arg Gln Asn His Leu Pro Arg Gly Arg Glu Arg Arg Gln
420 425

<210> 3

<211> 1287

<212> DNA

<213> Infectious laryngotracheitis virus

<400> 3

atggctagct tgaaaatgct gatctgcgtg tgcgtggcaa tcctgatccc atctacccta	60
tctcaagatt cacacggaat tgccggaata atagaccctc gtgatacagc cagcatggat	120
gttggaaaaa tctctttctc cgaagccatt gggtcggggg caccgaaaga accccagatt	180
agaaacagaa tttttgcgtg ctcattctcca actggcgcca gtgttgcgag gcttgcccag	240
ccacgacatt gtcaccgaca tgccgattcg actaacatga ctgaaggaat tgccgtagtc	300
ttcaagcaaa acattgcccc gtacgtcttt aatgtgactc tatactataa acatataacc	360
acagttacta cgtgggcatt attctcaaga ccccaaataa caaatgagta cgtgaccagg	420
gttccaatag actatcatga aattgtcagg attgatcgat cgggagaatg ctcattccaaa	480
gcaacgtatc ataaaaatth catgtttttt gaagcttacg acaatgatga acgagaaaaa	540
aaattgcccc tggttccatc actgttaaga tcaactgtct ccaaggcggt tcatacaact	600
aaactttacta agcgacatca aaccctggga taccgaacgt ctacatcggt cgactgtgtt	660
gtggaatatc tacaggctag atctgtatac ccgtatgatt actttggaat ggcgacagg	720
gatacagtag aaatttctcc cttttatacc aaaaacacga ccggaccaag gcgtcacagt	780
gtctacagag actatagatt tctcgaaatc gcaaatatc aagtcaggga tttggaaacc	840
ggacaaataa gacccccctaa aaaaagaaac tttctaacag atgaacaatt cactataggc	900
tgggatgcaa tggaagaaaa ggaatctgta tgtactctca gtaaatggat tgaagtcctg	960
gaagcagttc gtgtttctgta caaaaacagt taccactttt cacttaaaga tatgactatg	1020
acgttctcgt ccggaaaaaca accttttaac atcagcaggc ttcatttggc tgaatgcgtt	1080

cctaccatag cttcggaggc catagatggc atctttgcca gaaagtatag ttcgactcat 1140
 gtcggttctg gggacatcga atactatctc ggtagtggcg gatttctgat cgcatttcag 1200
 aaactcatga gccatggcctt ggctgaaatg tacctagaag aggcacaaaag acaaaatcat 1260
 ctcccgagag ggagagagcg tcgccaa 1287

<210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> SV40 pA signal

<400> 4

Gly	Asp	Leu	Tyr	Lys	Cys	Gly	Met	Ala	Asp	Tyr	Asp	His	Glu	Gln	Thr
1				5					10					15	

Val	Arg	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Met	Ser	Leu	Gly	Thr	Val	Asn	Arg	Pro
			20					25					30		

Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Ser	Ser	His
		35				40	

<210> 5
 <211> 120
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> SV40 pA signal

<400> 5
 ggcgacctct acaaatgttg tatggctgat tatgatcatg aacagactgt gaggactgag 60
 gggcctgaaa tgagccttgg gactgtgaat cggccaataa ggccctattta ctcategcat 120

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 6
tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 7
ttcggtagcg gttattatta ttttttgac

29

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 8
gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt

30

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 9
gcactcggat ccattgacat ggctagc

27

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 10
agatgccatc tatggcctcc gaagctatgg 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 11
tggctgaatg cgttcctacc atagcttcgg 30

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 12
cgggtacctt attcgtcttc gctttcttc 29

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 13
gccaggcgcg ccatttaccg tcattgacgt 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 14

acgtcaatga cggtaaatgg cgcgcctggc 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 15
cgtctagagg atctgacggg tcactaaacc 30

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 16
ggctagatct gtatacccggt atgattactt 30

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 17
cggtagctta ttgtctaaca aatgtatagt 30

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 18
cggtagctta atctccacgt attacagtgt 30

<210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 19
 ttacatatatt atctccacgt attacagtgt 30

<210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 20
 acgtggagat aaatatgtaa tgaacctgaa 30

<210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Synthetic

 <400> 21
 cggtagctta ttctgtcttcg ctttcttctg 30

<210> 22
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Recombinant herpes virus turkey

 <400> 22
 atggctagct tgaaaatgct gatctgcgtg tgcgtggcaa tcctgatccc atctacccta 60

 tctcaagatt cacacggaat tgccggaata atagaccctc gtgatacagc cagcatggat 120

 gttggaaaaa tctctttctc cgaagccatt gggtcggggg caccgaaaga accccagatt 180

 agaaacagaa tttttgcgtg ctcatctcca actggcgcca gtgttgcgag gcttgcccag 240

ccacgacatt gtcaccgaca tgccgattcg actaacatga ctgaagggaat tgccgtagtc	300
ttcaagcaaa acattgcccc gtacgtcttt aatgtgactc tatactataa acatataacc	360
acagttacta cgtgggcatt attctcaaga ccccaaataa caaatgagta cgtgaccagg	420
gttccaatag actatcatga aattgtcagg attgatcgat cgggagaatg ctcattccaaa	480
gcaacgtatc ataaaaattt catgtttttt gaagcttacg acaatgatga acgagaaaaa	540
aaattgcccc tggttccatc actgttaaga tcaactgtct ccaaggcggt tcatacaact	600
aaactttacta agcgacatca aaccctggga taccgaacgt ctacatcgggt cgactgtgtt	660
gtggaatatc tacaggctag atctgtatac ccgtatgatt actttggaat ggcgacagggt	720
gatacagtag aaatttctcc cttttatacc aaaaaacacga ccggaccaag gcgtcacagt	780
gtctacagag actatagatt tctcgaaatc gcaaattatc aagtcaggga tttggaaacc	840
ggacaaaataa gaccccccta aaaaagaaac ttcttaacag atgaacaatt cactataggc	900
tgggatgcaa tgggaagaaaa ggaatctgta tgtactctca gtaaatggat tgaagtcccg	960
gaagcagttc gtgtttctgta caaaaacagt taccactttt cacttaaaga tatgactatg	1020
acgttctcgt ccggaaaaca accttttaac atcagcaggc ttcat ttggc tgaatgcgtt	1080
cctaccatag cttcggaggc catagatggc atctttgcc aagagtatag ttcgactcat	1140
gtccgttctg gggacatcga atactatctc ggtagtggcg gat tttctgat cgcatttcag	1200
aaactcatga gccatggctt ggctgaaatg tacttagaag aggcacaaag acaaaatcat	1260
ctcccgagag ggagagagcg tcgccaaaggc gacctctaca aatgtggtat ggctgattat	1320
gatcatgaac agactgtgag gactgagggg cctgaaatga gccttgggac tgtgaatcgg	1380
ccaataaggc ctatttactc atcgcat tag	1410

<210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic

<400> 23
cggtacctta ttggcgacgc tctctccctc 30

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 24
ggggaagtct tccggttaag ggac 24

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 25
cataccacat ttgtagaggc cctattggcg 30

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 26
cgagagggag agagcgtcgc caataggacc 30

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

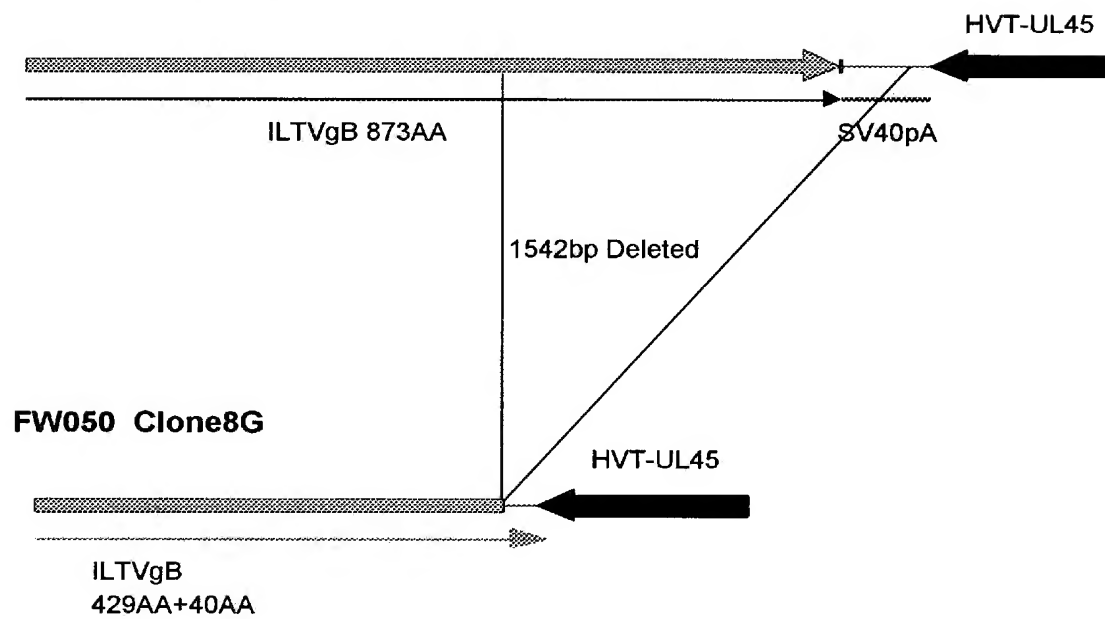
<220>
<223> Synthetic

<400> 27
tagcggcacg gaaacagata gaga 24

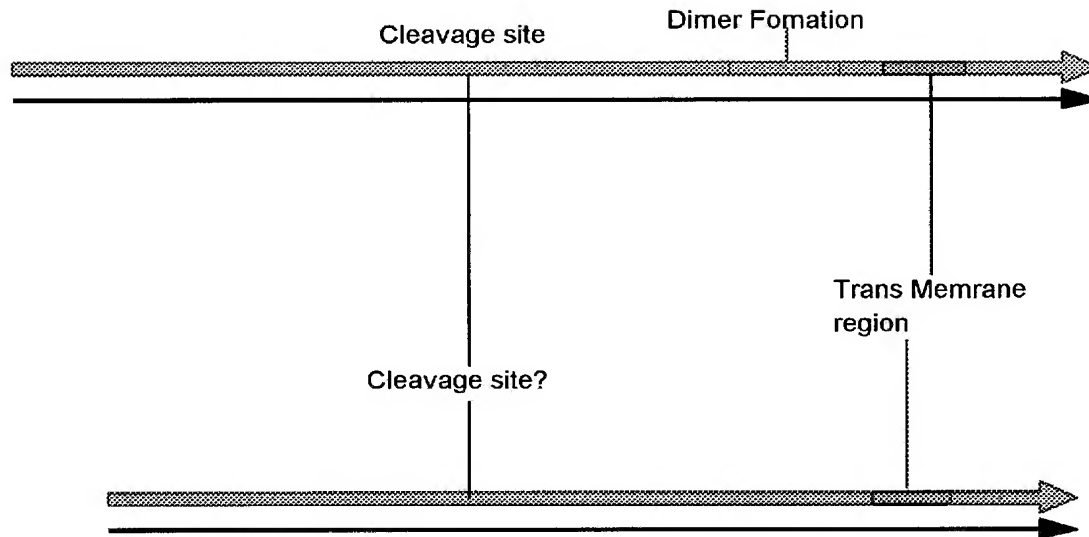
【書類名】 図面

【図 1】

p45/46PecILgBlac



**HSV1-gB
(2712bp:904AA)**



P-BglIII



A-R



gB-a(623AA) (p45/46PecI_{LgBa}, p45/46PecI_{LgBalac})



B-R



gB-b(691AA) (p45/46PecI_{LgBb}, p45/46PecI_{LgBblac})



CDE-R



gB-c(803AA) (p45/46PecI_{LgBc}, p45/46PecI_{LgBclac})



junction marker



C-F & C-R



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 組み換え体中で安定して存在できる I L T V の g B 遺伝子の部分配列を有する組み換えヘルペスウイルス、及び抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンを提供する。

【解決手段】 伝染性喉頭気管炎ウイルスの g B 遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸 4 2 9 個からなるポリペプチド、又は、その 1 つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたポリペプチドをコードする D N A を有する組み換えヘルペスウイルス（但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く）。

【選択図】 図 1

出願人履歴

0 0 0 2 2 9 1 1 7

19900822

新規登録

東京都千代田区丸の内 2 丁目 6 番 1 号

日本ゼオン株式会社

0 0 0 2 2 9 1 1 7

20050401

住所変更

東京都千代田区丸の内 一丁目 6 番 2 号

日本ゼオン株式会社